

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-73595

(43)公開日 平成10年(1998)3月17日

(51)Int.Cl. ⁹	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/543	5 8 1		G 0 1 N 33/543	5 8 1 B

審査請求 未請求 請求項の数5 O L (全 7 頁)

(21)出願番号 特願平8-231827

(22)出願日 平成8年(1996)9月2日

(71)出願人 591086706

軽部 征夫

神奈川県川崎市宮前区東有馬1丁目3番地
16

(71)出願人 591258484

株式会社エイアンドティー

東京都日野市日野320番地の11

(71)出願人 000003182

株式会社トクヤマ

山口県徳山市御影町1番1号

(72)発明者 岩田 恵助

埼玉県久喜市青毛1192-2

(74)代理人 弁理士 大島 正孝

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 免疫学的反応性物質の存在を検出又は測定する方法及びそれに用いる試薬

(57)【要約】

【課題】 免疫学的反応物質を迅速且つ簡便にしかも高感度で検出又は測定する方法を提供すること。

【解決手段】 担体に抗原もしくは抗体を感作した試薬を、予め微小電圧を印加して用いる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 担体に抗原もしくは抗体を感作した試薬を用いて、免疫学的凝集反応により免疫学的反応性物質を検出又は測定する方法であって、該試薬として予め微小電圧を印加した試薬を用いることを特徴とする方法。

【請求項2】 微小電圧が直流、直流パルスもしくは交流に由来する請求項1の方法。

【請求項3】 微小電圧は試薬を含む水系媒体が電気分解を実質的に起こさない電圧である請求項1の方法。

【請求項4】 担体の平均粒子径が $0.01\sim 1\mu\text{m}$ である請求項1の方法。

【請求項5】 予め微小電圧が印加された、抗体もしくは抗原で感作された担体からなる試薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は担体粒子を用いた免疫学的凝集反応により、免疫学的反応性物質を検出又は測定する方法に関する。更に詳しくは、予め微小電圧を印加された試薬を用いることにより、免疫学的反応物質を迅速且つ簡便にしかも高感度で検出又は測定する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】免疫学的反応性物質は、免疫学的凝集反応により、不溶性凝集塊を形成するのでこれを検出することにより、免疫学的反応性物質の存在を検出又は測定することが可能である。免疫学的反応性物質を検出又は測定する方法として、例えば、酵素免疫測定法、放射線免疫測定法が従来から用いられている。これらの方法は高感度であり精度も高い。しかし、酵素や放射線を使用するため試薬が不安定であることや保管・保存上の規制があることから、測定において細かい配慮や技術あるいは特別な設備等が要求されるので、より簡便な方法が求められていた。また、これらの方法は測定に時間を要するため、緊急検査においては対処が困難とされ、高感度且つ迅速な方法が盛んに研究されるようになった。

【0003】1970年以降、ラテックス、リボソーム等の担体を用いた免疫学的凝集反応を測定する方法として光学的分析法（比濁法やカウンティング法）が開発されている。これら免疫学的凝集反応は、一般に攪拌翼等で攪拌されることにより開始され、 $37^{\circ}\text{C}\sim 45^{\circ}\text{C}$ の温度下で行われている。このとき測定（反応）に要する時間は $5\sim 20$ 分である。これは酵素免疫測定や放射線免疫測定に比べ迅速であるが、測定感度・特異性等において、段階的に改善されつつあるものの前記方法に劣り、応用範囲が限定される。

【0004】該反応系に直流パルスや交流電圧を印加することによって、免疫学的凝集反応を迅速にしかも高感度で測定する方法が知られている。例えば、民谷らによるBiosensors、3(3)、139-146頁(1988)には、ヒト免疫グロブリンGを $1.0\mu\text{m}$ ラテック

ス粒子に結合させた試薬と免疫グロブリンGを電極を備えたセルにて混合後、波高値 200V （電界強度 $200\text{V}/\text{mm}$ ）の直流パルス電圧を印加して、10分後に50%の凝集度が得られたと記載されている。また、特開平7-83928号では、 10mM 以上の塩の共存下に $5\sim 50\text{V}/\text{mm}$ の電界強度になるように交流電圧を該反応系に印加する方法を提案している。いずれも、これら変動する電圧を印加することによって、担体粒子のパールチェイン化により、凝集塊の形成を促進させる効果による。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、免疫学的凝集反応に汎用されているラテックス試薬（粒子径 $1\mu\text{m}$ 未満）では、パールチェイン化は困難であり、高感度化は期待できない。前記特許公開公報にも、好ましい担体粒子の平均径は $0.5\sim 10\mu\text{m}$ と記載されている。本発明者らは、一般に高感度で迅速且つ簡便であると評価されているラテックス比濁法に使用されている $0.1\sim 0.5\mu\text{m}$ の担体粒子からなる試薬を用いて、従来法よりも更に迅速にしかも高感度で免疫学的反応性物質の存在を検出又は測定する方法を知見し、本発明に到達した。

【0006】

【課題を解決するための手段】すなわち、本発明は、担体に抗原もしくは抗体を感作した試薬を用いて、免疫学的凝集反応により免疫学的反応性物質を検出又は測定する方法であって、該試薬として予め微小電圧を印加した試薬を用いる方法である。また、本発明は該方法に使用するための予め微小電圧が印加された、抗原もしくは抗体で感作された担体からなる試薬を提供するものでもある。本発明において、免疫学的凝集反応とは、抗原抗体反応、特異的レセプターとの反応等を利用した方法であり、定性法及び定量法の両方を含むものである。

【0007】本発明における免疫学的反応性物質とは、上記の免疫学的凝集反応によってラテックス、リボソーム等を担体として使用する凝集法で測定され得る物質から選択できる。例えば、CRP、HBs抗原、HBs抗体、HCV抗体、HIV抗体、TP抗体等の感染症マーカー、D-ダイマー、プロテインC、プロテインS、ATIII等の凝固線溶系マーカー、AFP、CEA、CA19-9等の腫瘍マーカー、TSH、プロラクチン、インスリン等のホルモン、 $\beta 2\text{m}$ 、ミオグロビン、ミオシン等の組織成分、DNA等の核酸が挙げられる。また、検出可能な濃度は、概ね $0.05\text{ng}/\text{ml}\sim 50\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは $0.1\text{ng}/\text{ml}\sim 10\mu\text{g}/\text{ml}$ である。感作する抗原もしくは抗体としては、上記免疫学的反応性物質を免疫学的に認識しうる抗原又は抗体が用いられる。

【0008】本発明で用いられる担体粒子としては、例えばラテックス、リボソーム、金コロイド等が挙げられ

るが、好ましくはラテックス粒子である。ラテックス粒子としては、一般に免疫学的凝集法に用いられ、知られているものが使用できる。担体粒子の平均径は、ラテックス粒子の場合、 $0.01 \sim 1 \mu\text{m}$ が好ましい。より好ましくは、 $0.05 \sim 0.5 \mu\text{m}$ である。最も好ましくは、 $0.1 \sim 0.3 \mu\text{m}$ である。平均径が $1 \mu\text{m}$ を超えると粒子のブラウン運動等が起こりにくくなるので好ましくない。ラテックス粒子への抗体もしくは抗原の感作は、例えば、従来周知ないし公知の方法で吸着又は結合させることにより実施することができる。

【0009】本発明の微小電圧は直流、直流パルスもしくは交流に由来するものであり、試薬を含む水系媒体が電気分解を実質的に起こさない範囲の電圧、例えば試薬を含む水系媒体の電気伝導度が 17.4 mS/cm （生理食塩水相当）のとき、電界強度 2.4 V/mm の直流パルス電圧（パルス幅 $10 \mu\text{S}$ 、 10 KHz ）等である。しかし、前記した電圧は電極の材質、面積、印加時間等により変動する。本発明における交流電圧の波形は、連続波、パルス波のいずれであってもよく、また任意の形状とし得るが、好ましくは正弦波、方形波、矩形波である。交流電圧の周波数は、検討した範囲内では、免疫学的凝集反応の速度に大きく影響しないが、好ましくは $1 \text{ KHz} \sim 1 \text{ MHz}$ の周波数である。

【0010】本発明において、抗原もしくは抗体で感作された担体からなる試薬に予め微小電圧を印加した前処理試薬を該測定系に用いるとき、前処理後できるだけ速やかに、好ましくは前処理後約10分以内に使用することが好ましい。前処理直後に使用するのがより好ましい。

【0011】本発明において、試薬に微小電圧を印加する装置は、例えば図1又は図4に示すように、直流パルス電圧、交流電圧、直流電圧等の任意電圧が印加できる電源装置、試薬に微小電圧を印加するための容器内側面に電極を貼り付けた電極付き容器、電圧、周波数、パルス幅をモニターするためのオシロスコープ等からなる。電源装置としては、任意のパルス発生装置、例えば市販のファンクションジェネレータや細胞刺激装置等を使用することができる。電極付き容器としては、ガラス、プラスチック等の絶縁性容器を用いることができ、電極材料としては、白金、ニッケル等を用いることができる。

【0012】免疫学的反応性物質の存在を検出又は測定する方法としては、通常、検体を緩衝液を主成分とする溶液に加え、室温 $\sim 37^\circ\text{C}$ で、 $0.5 \sim 3$ 分間処理した後、上記前処理試薬を加え、濁度測定を行う分光光度計を用いて、濁度変化量を求める方法により実施される。

【0013】本発明に用いられる試薬は、通常、水系媒体中に分散して用いられる。試薬を含む水系媒体中の塩濃度は特に規定されないが、好ましくは、電気伝導度 $0 \sim 100 \text{ mS/cm}$ となる濃度である。より好ましくは、 $2 \sim 60 \text{ mS/cm}$ である。塩としては、塩化ナト

リウム、塩化カリウム、硝酸ナトリウム、硝酸アンモニウム等が挙げられるが、特に塩化ナトリウム、塩化カリウムが好ましい。試薬を含む水系媒体の組成としては、当業者にはよく知られている組成が使用できる。例えば、アルブミン等のタンパク、ポリエチレングリコール等の高分子、ツイーン、トライトン等の界面活性剤、塩化コリン等の塩化物、アルギニン、アスパラギン等のアミノ酸類、アジ化ナトリウム等の防腐剤等が添加されていてもよい。電気伝導度を小さくした方が、印加できる電界強度が大きくなるので免疫学的凝集反応の促進効果が得られ易く望ましい。

【0014】

【実施例】以下、実施例及び比較例をもって本発明を詳細に説明するが、これらは本発明を限定するものではない。

実施例1

(1) $\beta 2 \text{ m}$ ラテックス試薬の調製

10 mg の抗 $\beta 2 \text{ m}$ 抗体を 9.5 ml のグリシン緩衝液（以下GBSと略す）に溶解し、 0.5 ml のラテックス（粒子径 $0.12 \mu\text{m}$ 、固形分 10% 懸濁液）を加え、 37°C で一晩、インキュベーションした後、感作したラテックス懸濁液を遠心分離して上清を除去した。沈殿をGBS 20 ml に懸濁させ、 $\beta 2 \text{ m}$ ラテックス試薬を調製した。

(2) 直流パルス電圧印加装置

図1の実験装置を使用して、直流パルス電圧を印加した。（電極間の距離 4 mm ）

【0015】(3) 測定方法

$\beta 2 \text{ m}$ ラテックス試薬を電極を張り合わせた容器に入れ、予め直流パルス電圧（波高値 4.5 V 、パルス幅 $10 \mu\text{s}$ 、周波数 10 KHz ）を2分間印加した。印加15秒後に、前処理試薬 $300 \mu\text{l}$ を、GBS $600 \mu\text{l}$ に検体 $45 \mu\text{l}$ を加えた溶液に混和した。直ちに、分光光度計（日立U-3200）を用いて濁度変化のタイムコースを測定した。なお、 0.2% 牛血清アルブミン含有グリシン緩衝液（以下 $0.2\% \text{ BSA-GBS}$ と略す）を用いて、 $\beta 2 \text{ m}$ 標準を希釈して $\beta 2 \text{ m}$ 濃度 0 ng/ml 、 12.5 ng/ml の検体を調整し測定に使用した。

(4) 結果

表1および図2に示した。図2において、実施例1は、直流パルス電圧を印加した $\beta 2 \text{ m}$ 濃度 12.5 ng/ml の検体についての濁度変化であり、参考例1は、直流パルス電圧を印加した $\beta 2 \text{ m}$ 濃度が 0 ng/ml の検体についての濁度変化である。

【0016】比較例1

実施例1で用いたと同じ各検体と $\beta 2 \text{ m}$ ラテックス試薬を使用した。試薬の電氣的な前処理を行わない他は、実施例1と同様に操作して、濁度変化のタイムコースを測定した。結果を表1および図2に示した。比較例1は、直

流パルス電圧を印加していない β 2m濃度12.5 ng/mlの検体についての濁度変化であり(従来法)、比較参考例1は、直流パルス電圧を印加していない β 2m

濃度0 ng/mlの検体についての濁度変化である。

【0017】

【表1】

	各時間における ΔOD 値(カウント)					
	0秒	60秒	120秒	180秒	240秒	300秒
実施例1	0	18	38	38	42	44
比較例1	0	5	9	8	13	13
参考例1	0	5	2	-6	-5	-8
比較参考例1	0	-3	-7	-12	-14	-14

【0018】比較例2

実施例1で用いたと同じ各検体と β 2mラテックス試薬を使用した。GBS600 μ lに検体45 μ lを加え、電極を張り合わせた容器に入れ、直流パルス電圧(波高値4.5V、パルス幅10 μ 秒、周波数10KHz)を2分間印加した。この電気的前処理を行った検体試液に

β 2mラテックス試薬300 μ lを加え、直ちに、分光光度計(日立U-3200)を用いて濁度変化のタイムコースを測定した。結果を表2および図3に示した。なお、図3には、実施例1の結果も併記した。

【0019】

【表2】

	各時間における ΔOD 値(カウント)					
	0秒	60秒	120秒	180秒	240秒	300秒
実施例1	0	18	38	38	42	44
比較例2	0	3	6	7	14	12

【0020】図2に示した結果から、本発明は従来の方法(試薬の電気的前処理を行わず、従来どおりに使用する、比較例1)に比べ短時間で且つ高感度に測定することができることが分かる。また、図3に示した結果から、ラテックスを含む試液に電気的前処理を行うことにより免疫学的凝集反応を促進化且つ高感度化できることが分かる。

【0021】実施例2

(1) AFPラテックス試薬の調製

5mgの抗AFP抗体を9.5mlのグリシン緩衝液(以下GBSと略す)に溶解し、0.5mlのラテックス(粒子径0.22 μ m、固形分10%懸濁液)を加え、室温で2時間攪拌した後、感作したラテックス懸濁液を遠心分離して上清を除去した。沈殿を33mlの0.2%BSA-GBSに懸濁させ、AFPラテックス試薬を調製した。

(2) 交流電圧印加装置

図4の実験装置を使用して、交流電圧を印加した。(電極間の距離3mm)

【0022】(3)測定方法

AFPラテックス試薬を電極を張り合わせた容器に入れ、交流電圧(0V \sim \pm 15V、周波数10KHz)を2分間印加した。印加15秒後に前処理試薬300 μ lをりん酸緩衝液(15mMりん酸、0.4%ポリエチレングリコール6000、2%塩化ナトリウム、0.1%アジ化ナトリウム含有、以下PBSと略す)600 μ lに検体60 μ l加えた溶液に混和した。直ちに、分光光度計(日立U-3200)を用いて濁度変化のタイムコースを測定し、4分間の濁度差(ΔOD 572nm)を求めた。なお、0.2%BSA-GBSを用いて、A

FP標準を希釈してAFP濃度2.5 ng/mlの検体を調整し測定に使用した。

(4) 結果

表3および図5に示した結果から、印加電圧としては電界強度が大きい方が免疫学的凝集反応の促進効果が得られることが分かる。

【0023】

【表3】

AC印加電圧(V)	ΔOD (カウント)
0	16
6.5	45
15	84

【0024】実施例3

(1) AFPラテックス試薬の調製

実施例2と同様して、AFPラテックス試薬を調製した。

(2) 交流電圧印加装置

図4の実験装置を使用して、交流電圧を印加した。(電極間の距離3mm)

【0025】(3)測定方法

AFPラテックス試薬を電極を張り合わせた容器に入れ、交流電圧(\pm 15V、周波数10KHz)を2分間印加した。印加15秒後に前処理試薬300 μ lをPBS600 μ lに検体60 μ l加えた溶液に混和した。直ちに、分光光度計(日立U-3200)を用いて濁度変化のタイムコースを測定し、4分間の濁度差(ΔOD 572nm)を求めた。なお、0.2%BSA-GBSを用いて、AFP標準を希釈してAFP濃度0 ng/ml

1、0.625 ng/ml、1.25 ng/ml、2.5 ng/mlの検体を調整し測定に使用した。

(4) 結果

表4および図6に示した結果から、本発明は従来の方法（電気的な手法による前処理を行っていない試薬を使用）に比べ非常に短時間で、且つ高感度に測定することができることが分かる。

【0026】比較例3

実施例3の各検体とAFPラテックス試薬を使用して、試薬の電気的前処理を行わない他は、実施例2と同様に操作して濁度変化のタイムコースを測定し、5分間の濁度差を求めた。結果を表4および図6に示した。

【0027】

【表4】

AFP (ng/ml)	ΔOD (カウント)	
	実施例3	比較例3
0	30	15
0.625	44	17
1.25	59	23
2.5	84	21

【0028】実施例4

電気分解を誘発する電圧の測定

塩化ナトリウムを精製水に溶解し、塩化ナトリウム濃度0～600 mMに調整した。各濃度の塩化ナトリウム水溶液の電気伝導度と電気分解開始電圧を測定した。印加

電圧は、直流パルス電圧（パルス幅10 μ 秒、周波数10 KHz）を用いた。結果を表5および図7に示した。

【0029】

【表5】

NaCl (mM)	電気伝導度 (mS/cm)	最大電圧 (V)
0	0	50
25	2.9	18.85
50	5.8	13.15
100	11.6	9.12
150	17.4	7.14
300	34.8	4.27
600	70	2.71

【0030】図7（A）から、電気伝導度と塩濃度は比例関係にあり、また図7（B）から、電気分解を誘発する電圧は、電気伝導度と対数関数の関係にあり、試薬の電気伝導度が小さいほど電気分解を起こしにくいことが分かる。

【0031】

【発明の効果】本発明によれば、従来の測定方法よりも短時間に、しかも高感度で免疫学的反応性物質の存在を検出又は測定することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明で使用した直流パルス電圧印加実験装置の概略図である。

【図2】予め直流パルス電圧をラテックス試薬に印加した前処理試薬を用いる本発明方法と、従来法との免疫学的凝集反応による濁度変化のタイムコースを比較したグラフである。

【図3】予め直流パルス電圧を印加する前処理を、ラテ

ックスを含む試薬に実施した本発明方法と、ラテックスを含まない試薬に実施した場合（比較例3）との、免疫学的凝集反応による濁度変化のタイムコースを比較したグラフである。

【図4】本発明で使用した交流電圧印加実験装置の概略図である。

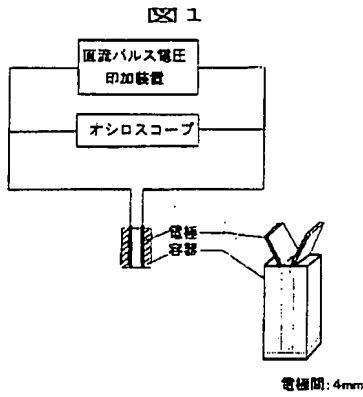
【図5】予め交流電圧をラテックス試薬に印加する前処理を行う際の印加電圧の大きさと濁度変化との関係を表すグラフである。

【図6】ヒトAFP濃度と免疫学的凝集反応による濁度変化との関係について、予め交流電圧をラテックス試薬に印加した前処理試薬を用いる本発明方法と、従来法との比較を表すグラフである。

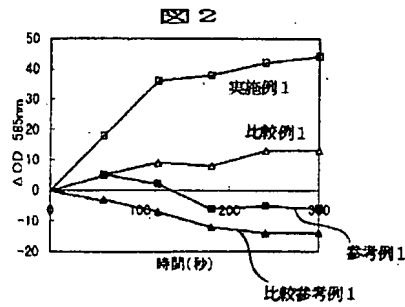
【図7】（A）塩濃度と電気伝導度との関係を表すグラフである。

（B）電気伝導度と電気分解の誘発電圧との関係を表すグラフである。

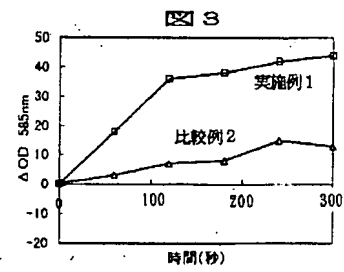
【図1】



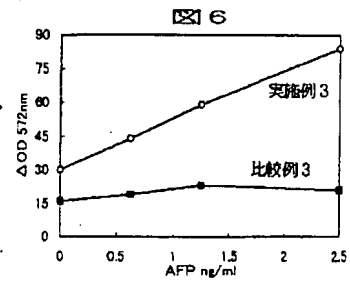
【図2】



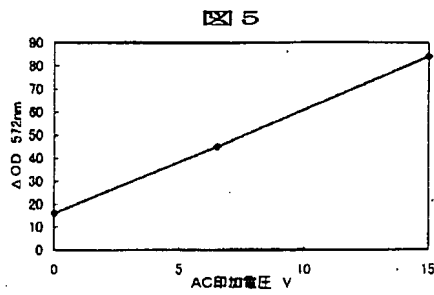
【図3】



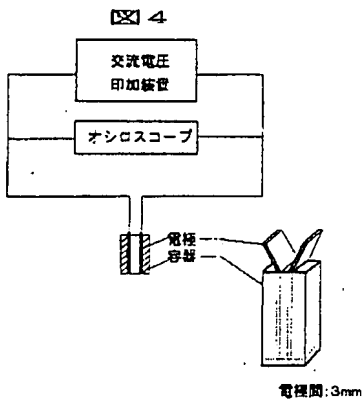
【図6】



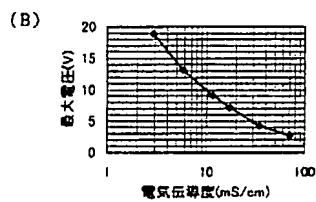
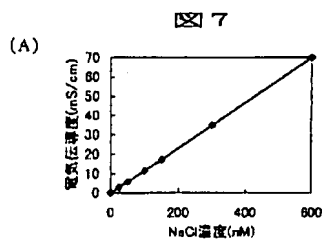
【図5】



【図4】



【図7】



フロントページの続き

(72)発明者 吉村 佳典

茨城県つくば市千現1-13-7 イーグル
1 201号

(72)発明者 軽部 征夫

神奈川県川崎市宮前区東有馬1-3-16